

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	FI
A 6 1 K 39/395		9284-4C	A 6 1 K 39/395 W
C 0 7 K 16/18		8517-4H	C 0 7 K 16/18

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 15 頁)

(21) 出願番号 特願平7-505621
 (86) (22) 出願日 平成6年(1994)7月28日
 (85) 翻訳文提出日 平成8年(1996)1月29日
 (86) 国際出願番号 PCT/FR94/00955
 (87) 国際公開番号 WO95/03826
 (87) 国際公開日 平成7年(1995)2月9日
 (31) 優先権主張番号 93/09416
 (32) 優先日 1993年7月30日
 (33) 優先権主張国 フランス (FR)
 (81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), AU, CA, JP, US

(71) 出願人 パストゥール メリユ セリユム エ ヴ
 アサン
 フランス国 69007 リヨン アヴニ
 ルクレール 58
 (72) 発明者 グランジョルジュ, ミシエル, ガストン,
 ジョゼフ
 フランス国 69670 ヴォーニュレイ リ
 ュ ドュ ルクレ 12
 (72) 発明者 ガテル, ポール, アニック
 フランス国 69300 カリュイル ルウト
 ドゥ ストラスプール 99
 (74) 代理人 弁理士 越場 隆 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 安定化された免疫グロブリンの調製物と、その調製方法

(57) 【要約】

液体状態を維持するための安定剤として非イオン性界面活性剤を0.1 g/l 以下の濃度で含み、アルブミンを実質的に含まないヒトまたは動物の免疫グロブリン、特にポリクローン性免疫グロブリン調製物。

BEST AVAILABLE COPY

【特許請求の範囲】

1. 液体状態で保持するための安定剤として非イオン性界面活性剤を 0.1 g/l 以下の濃度で含み、アルブミンを実質的に含まないヒトまたは動物の免疫グロブリン、特にポリクローン性免疫グロブリン調製物。
2. 非イオン性界面活性剤の濃度が約0.02～0.05g/l、好ましくは約0.025 g/l である請求項 1 に記載の調製物。
3. 30～120 g/l の免疫グロブリンを含有する請求項 1 または 2 に記載の調製物。
4. 非イオン界面活性剤がポリオキシエチレンソルビタンモノオレアート(20)、デカエチレングリコールオクチルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート(20)、ポリオキシエチレン／ポリオキシプロピレン混合コポリマーおよびポリオキシエチレンおよびポリエチレングリコールラウレート600 で構成される群の中から選択される請求項 1～3 のいずれか一項に記載の調製物。
5. 凍結乾燥用安定剤を含む請求項 1～4 のいずれか一項に記載の調製物。
6. 液体で貯蔵するための安定剤としての非イオン性界面活性剤を最終調製物での濃度が 0.1 g/l 以下となるように調節物に添加することを特徴とするポリクローン性免疫グロブリン調製物の安定化方法。

【発明の詳細な説明】

安定化された免疫グロブリンの調製物と、その調製方法

本発明はヒトまたは動物の免疫グロブリン(Ig)、特に、血液のポリクローン性免疫グロブリン調製物に関するものである。本発明は、さらに、免疫グロブリンの安定化方法に関するものである。

免疫グロブリンは予防と治療で広く利用されているが、それを静脈注射投与する場合にはその抗補体活性(Igを変性して集塊およびポリマーを形成させる)をできる限り抑制する必要がある。

ファルマヨーロッパ(Pharmeuropa (3 (4), 1991年12月, 259-268))で公開された欧州規格では、静脈注射で投与するためのイムノグロブリン溶液は集塊およびポリマーの含有率が全蛋白質の3%以下で、抗補体活性がIg 1mg当たり1 CH 50単位以下であることが要求される。

集塊の形成は免疫グロブリン溶液の調製時のみに生じるのではなく、それを液体で保存する間、特に、その操作中にも生じる。すなわち、免疫グロブリンは液体/気体界面および液体/固体界面で変性する傾向があり、その結果、可溶性または不溶性の集塊を生じて抗補体活性が上昇する。

フランス国特許第 2,301,266号に記載の医薬としての静脈注射可能なγグロブリンはγグロブリンをグリシンとアルブミンとを含む緩衝剤水溶液に溶かして調製される。また、この特許では表面変性(液体/空気界面または液体/固体界面での)を防止または軽減するために、得られた薬剤調製物に非イオン性

界面活性剤を添加することを提案している。この特許で提案されている界面活性剤はトウイーン(Tween)化合物またはプルロニック(Pluronic) 68 である。明細書に記載された唯一の実施例では Tween 80 を 0.1%すなわち 1 g/l の濃度で使用することが推奨されている。従って、γグロブリン製剤ではグリシンと、アルブミンと、濃度 1 g/l 程度の非イオン性界面活性剤とを組み合わせる必要がある。

欧州特許第 448 075号にはメンブレン濾過によって静脈注射用 Ig 調製物を製造する方法が記載されている。この方法では界面活性剤の安定剤、例えばプルロ

ニック (Pluronic) 等の非イオン性界面活性剤を用いて濾過中のIgの変性を防いでいる。推奨されている安定剤の濃度は 0.5~50g/l であり、最終生成物中には非常に高濃度の界面活性が含有されることになる。

レビン(H. L. Levin) 達の「J. of Parenteral Science and Technology」、第45巻、(3) 1991年 5-6 月、第 160~165頁には攪拌試験で低濃縮のモノクローナル抗体溶液の表面変性を防止するための非イオン性界面活性剤の効果に関する研究が報告された。著者達は 0.1%程度すなわち 1g/l に対応する濃度が効果的な濃度であると報告しているが、0.1g/l の濃度では保護効果は全く得られない。

このような高濃度の界面活性剤は静脈注射の場合には深刻な問題を消滅させるということが分かっている。事実、米国特許第 4,439,421号には、血液細胞に対する安全上の理由から上記フランス国特許に対応する米国特許第 4,093,606号に記載のような非イオン性界面活性剤は用いるべきでないと記載されている。このことは克蘭ツ(J. C. Krants)達が「J. Pharmacol Exp. Ther.」、93、1948、第188~195頁で行ったトゥイーン 20

(Tween 20)の濃度 1g/l での溶血力に関する研究と一致する。

上記米国特許は数種類の安定剤、高分子、タンパク質および低分子量ポリオールを組み合わせて、凍結乾燥用Ig溶液を安定化する方法を提案している。ポリエチレングリコールをヒトアルブミンおよびグルコースと組み合わせるのが好ましい。

事実、アルブミンは免疫グロブリン用の効果的な安定剤となることは知られている。しかし、現在の医薬の流れは、ウィルス汚染の危険のあるヒトや動物由来の物質の使用はできるだけ避けるのが望ましいとされている。

本出願人は、驚くべきことに、非イオン性界面活性剤を非常に低濃度で用いることによって、アルブミンのような従来の安定剤を用いずに安定化された液体状の免疫グロブリン溶液を調製することができるということを見出した。

従って、本発明の対象は、液体状で保存するための安定剤として非イオン性の界面活性剤を 0.1g/l以下の濃度で含み、実質的にアルブミンを含まない、ヒト

または動物の免疫グロブリン、特にポリクローン性免疫グロブリン、特にポリクロナール性 IgG の調製物にある。

「実質的にアルブミンを含まない」とは、セルロールアセテート電気泳動を用いたファーマヨーロッパ(Pharmeuropa)の方法でアルブミンが全く検出されないことを意味する。これはアルブミンの量でIgG の1%以下に相当する。

非イオン性界面活性剤の濃度は約0.02~0.05g/l、好ましくは0.025 g/lオーダーであるのが望ましい。

本発明調製物は30~120 g/lの免疫グロブリンを含有するのが好ましい。

非イオン性界面活性剤はポリオキシエチレンソルビタンモノ

オレート(20)、デカエチレングリコールオクチルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート(20)、ポリオキシエチレン/ポリオキシプロピレン混合コポリマーおよびポリオキシエチレンおよびポリエチレングリコールラウレート 600である。

本発明調製物は、従来のような一般的な凍結乾燥安定剤、例えば蔗糖を50~100 g/l の濃度でさらに含むことができる。

本発明の免疫グロブリン調製物は現在の基準で推奨される他の特性、例えば 4.0~7.4 のpH、280 mosmol/kg以上の浸透性〔浸透活性を有する溶質、例えば、無機塩（塩化ナトリウム等）、糖（グルコース、蔗糖、マルトース等）、糖アルコール（マンニトール、ソルビトール）またはアミノ酸（グリシン等）の添加〕を有するのが好ましい。

本発明で得られる調製物は、静脈投与用Ig溶液の使用安全基準すなわちバクテリアおよび菌類の繁殖が無く、非発熱性で、集塊およびポリマーの含有率が低く、補体活性が低いことを満足している。

本発明調製物中に存在する免疫グロブリンは、従来の蛋白質の分画法で血漿、血清または胎盤から得ることができ、必要な場合にはさらに集塊およびポリマーの含有率を下げる処理および/または調製物の抗補体を減少させる処理（例えばペプシンまたはプラスミンを用いた緩やかな処理、酸性pHでの分割、還元および/またはアルキル化による化学的変性またはPEGを用いた集塊およびポリマ

一の沈澱)を加えてもよい。

本発明調製物はそのまま使用可能な溶液であり、従って液体で保存するか、凍結乾燥した濃縮物を使用直前に溶かして溶液にすることもできる。

本発明は、さらに、ヒトまたは動物のポリクローン性免疫グロブリン調製物の安定化方法に関するものである。本発明方法では、最終調製物中での濃度を0.1 g/l となるように液体状態で保存するための非イオン性安定剤を調節物に添加する。非イオン性界面活性剤は約0.02~0.05g/lの濃度、好ましくは0.025g/l 程度の濃度で添加するのが好ましい。非イオン性界面活性剤は上記のものから選択することができる。界面活性剤はバイアル瓶に最後に封入する直前に添加するのが好ましいが、Igの抽出・精製プロセスの早い段階で添加することもできる。

以下、本発明の免疫グロブリン調製物を用いて行った試験を詳細に説明する。

攪拌テストで静脈投与用Igのバイアル瓶を乱暴に取扱った条件をシミュレートした。50ml容のI型ホウ珪酸塩ガラス瓶に無菌状態で20mlの滅菌済みのIg溶液(50 g/l)を充填し、バイアル瓶に室温20℃で、1~2時間、振動/オルタネーティング型のシェーカーで1分間に80回の水平振動を与えた。

溶液の抗補体活性(AcA)は上記「ファーマヨーロッパ」に記載の試験法で測定した。

試験 1

トウイーン (Tween80)の保護効果

静脈注射用Ig溶液の組成物:

Ig : 50g/l

蔗糖 : 100g/l

NaCl : 1 g/l

pH : 4.3

トウイーン (Tween 80) の濃度 : 0~100 mg/l

表 1

	Tween 80 (mg/l)			
	0	10	25	100
* 攪拌前のAcA	0.34	0.35	0.35	0.36
* 2 時間攪拌後のAcA	> 1.19	1.19	0.75	0.38

AcA : 抗補体活性

* CH 50mg/Ig

結果 :

明らかな保護効果は25mg/l以上の場合に見られる。この効果は100mg/lの界面活性剤を用いた場合ほぼ完全になる。

試験 2

トリトン(Triton) X 100の保護効果

試験 1 と同じにしたが、界面活性剤としてトゥイーン(Tween)80の代わりにトリトン(Triton) X 100を用いた。

表 2

	Triton X 100 (mg/l)			
	0	25	50	100
* 攪拌前のAcA	0.37	0.36	0.36	0.31
* 2 時間攪拌後のAcA	0.50	0.34	0.36	0.19

AcA : 抗補体活性

* CH 50mg/Ig

結果

最低の試験濃度すなわち25mg/lで完全な保護効果が得られる。

試験 3

トゥイーン (Tween80)の保護効果

実施例 1 と同じにしたが、攪拌時間を 2 時間でなく 1 時間にした。

表 3

	Tween 80 (mg/l)	
	0	25
* 攪拌前のAcA	0.41	0.33
* 1時間攪拌後のAcA	0.70	0.27

AcA : 抗補体活性

* CH 50mg/Ig

結果

このより緩やかな試験ではIgを完全に保護するには25mg/lのトウイーン(Tween)で十分である。

試験 4

アルブミンの保護効果

試験1と同じにしたが、保護物質としてトウイーン(Tween)80の代わりにヒトアルブミンを使用した。

表 4

	アルブミン (mg/l)			
	0	100	1000	10,000
* 攪拌前のAcA	0.34	0.36	0.26	0.29
* 2時間攪拌後のAcA	1.24	0.64	0.27	0.28

AcA : 抗補体活性

* CH 50mg/Ig

結果

アルブミンは 100~1000mg/lの濃度でIgに対する保護効果を発揮しはじめる。

好ましい非イオン性界面活性剤

トウイーン(Tween)80 : Atlas製のポリオキシエチレンソルビタンオレイルエステル

トリトン(Triton) X 100 : Rhom and Haas 製のポリオキシエチレンオクチルフェ

ニルエーテル

トウイーン(Tween) 20 : ポリオキシエチレンソルビタンラウリルエステル

プロニック(Pluronic) F 68 : Ugine Kuhlmann製のポリオキシエチレンおよびポリオキシプロピレンコポリマー

ポリエチレングリコールラウレート600 : Gattefosse製

トウイーン(Tween)80 は毒性がなく、医薬品または食品配合物としての報告が多い点で好ましい(シック(M. Schick) 編「非イオン性界面活性剤」 Marcel Dekker NY, 1967, 28, 923-970参照)。

【手続補正書】特許法第184条の8

【提出日】1995年7月11日

【補正内容】

界面活性剤を添加することを提案している。この特許で提案されている界面活性剤はトウイーン(Tween)化合物またはプルロニック(Pluronic) 68 である。明細書に記載された唯一の実施例では Tween 80 を 0.1% ずなわち 1 g/l の濃度で使用するが推奨されている。従って、γグロブリン製剤ではグリシンと、アルブミンと、濃度 1 g/l 程度の非イオン性界面活性剤とを組み合わせる必要がある。

1981年3月の日本国特許のアブストラクト5、第41 (C-047)、18には、調製物の凍結乾燥時に確実に安定化させるために界面活性剤を添加した抗 HB 免疫グロブリン調製物が開示されている。推奨されている界面活性剤濃度は 0.1 g/l ~ 0.5 g/l である。

WO-A-8,911,297号に開示の凍結乾燥モノクローナル抗体組成物の特許には界面活性剤の使用に関する記載はない。

ドイツ国特許第DE-A-3,208,523号には保護の目的でなく集塊

沈澱用物質として高濃度(1~3%)のプルロニック(PLURONIC)®を用いる方法が記載されている。この特許には界面活性特性についての記載はなく、免疫グロブリンを変性から保護する性質

に関する記載もない。プルロニック(PLURONIC)®の残留濃度は非常に高くなる。

欧州特許第 448 075号にはメンブレン濾過によって静脈注射用 Ig 調製物を製造する方法が記載されている。この方法では界面活性剤の安定剤、例えばプルロニック(Pluronic)等の非イオン性界面活性剤を用いて濾過中のIgの変性を防いでいる。推奨されている安定剤の濃度は 0.5~50g/l であり、最終生成物中には非常に高濃度な界面活性が含有されることになる。

レビン(H. L. Levin) 達の「J. of Parenteral Science and

Technology」、第45巻、(3) 1991年 5-6 月、第 160~165頁には攪拌試験で低濃

縮のモノクローナル抗体溶液の表面変性を防止するための非イオン性界面活性剤の効果に関する研究が報告された。著者達は 0.1%程度すなわち 1 g/l に対応する濃度が効果的な濃度であると報告しているが、0.1g/l の濃度では保護効果は全く得られない。

このような高濃度の表面活性剤は静脈注射の場合には深刻な問題を消滅させるということが分かっている。事実、米国特許第 4,439,421号には、血液細胞に対する安全上の理由から上記フランス国特許に対応する米国特許第 4,093,606号に記載のような非イオン性界面活性剤は用いるべきでないと記載されている。このことはクランツ(J. C. Krants)達が「J. Pharmacol Exp. Ther.」、93、1948、第188～195頁で行ったトウイーン 20

請求の範囲

1. 液体状態で保持するための安定剤として非イオン性界面活性剤を 0.1 g/l以下の濃度で含み、アルブミンを実質的に含まないヒトまたは動物の免疫グロブリン、特にポリクローン性免疫グロブリン調製物。
2. 非イオン性界面活性剤の濃度が約0.02～0.05g/l、好ましくは約0.025 g/lである請求項 1 に記載の調製物。
3. 30～120 g/lの免疫グロブリンを含有する請求項 1 または 2 に記載の調製物。
4. 非イオン界面活性剤がポリオキシエチレンソルビタンモノオレアート(20)、デカエチレングリコールオクチルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート(20)、ポリオキシエチレン／ポリオキシプロピレン混合コポリマーおよびポリオキシエチレンおよびポリエチレングリコールラウレート600で構成される群の中から選択される請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の調製物。
5. 凍結乾燥用安定剤を含む請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の調製物。
6. 液体で貯蔵するための安定剤としての非イオン性界面活性剤を最終調製物での濃度が 0.1g/l以下となるように調製物に添加することを特徴とするアルブミンを実質的に含まないポリクローン性免疫グロブリン調製物の安定化方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No
PCT/FR 94/00955A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 A61K39/395

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 5, no. 41 (C-047) 18 March 1981 & JP,A,55 164 630 (GREEN CROSS CORP) 22 December 1980 see abstract ---	1-6
X	EP,A,0 448 075 (MITSUBISHI RAYON CO.,LTD) 25 September 1991 cited in the application see column 5, line 45 - column 6, line 16 see column 8, line 33 - line 40 --- -/-	1-6

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 November 1994

Date of mailing of the international search report

29-11-1994

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Sitch, W

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No.

PCT/FR 94/00955

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JOURNAL OF PARENTERAL SCIENCE AND TECHNOLOGY, vol.45, no.3, 1991, PHILADELPHIA, PA, USA pages 160 - 165 LEVINE ET AL 'THE USE OF SURFACE TENSION MEASUREMENTS IN THE DESIGN OF ANTIBODY-BASED PRODUCT FORMULATIONS' cited in the application	1-4,6
Y	see the whole document cited in the application	5
Y	WO,A,89 11297 (CENTOCOR, INC.) 30 November 1989 see claims 1-21	5
Y	DE,A,32 08 523 (LABORATORIOS LANDERLAN, S.A.) 5 May 1983	5
A	see claims 1-10	1-4,6

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/FR 94/00955

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0448075	25-09-91	JP-A- 3271234 US-A- 5219999	03-12-91 15-06-93
WO-A-8911297	30-11-89	DE-T- 68908175 EP-A,8 0417193 JP-T- 3504605	03-03-94 20-03-91 09-10-91
DE-A-3208523	05-05-83	JP-A- 57206625	18-12-82

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

フロントページの続き

(72)発明者 マクラ, マリーーフランス, マルグリト,
アンドレ
フランス国 69005 リヨン リュ ドゥ
トゥールヴィエール 18デー